製品コード RR489

TaKaRa

SYBR® Premix Reagent Trial Pack

説明書

v201108Da

タカラバイオでは SYBR® Green Assay 用のリアルタイム PCR 試薬として以下の 3 種類の製品を販売しており、それぞれ反応特異性や増幅効率などの特性が異なります。本製品はこれら 3 種類の試薬の小包装セットであり、実験目的に適した試薬を選択するために使用します。各酵素の特性は、「実験条件の選び方」（9 ～ 10 ページ）を参照してください。

- SYBR® *Premix Ex Taq*（Perfect Real Time）（製品コード RR041）
- SYBR® *Premix Ex Taq* II（Perfect Real Time）（製品コード RR081）
- SYBR® Premix DimerEraser（Perfect Real Time）（製品コード RR091）

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ
- ABI PRISM® 7000、7500 および 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）
- LightCycler®（Roche Diagnostics 社）など

I. 原理

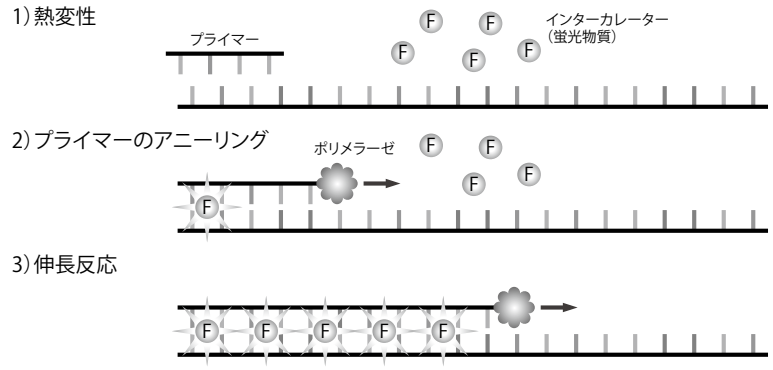
本製品では、*TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を行います。PCR 増幅産物は、SYBR® Green I によりリアルタイムでモニタリングできます。

1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることができます。
本製品では、増幅にホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. 蛍光検出法

[インターカレーター法]
二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。
ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。



II. 内容

SYBR® *Premix Ex Taq*（Perfect Real Time）（2 × conc.）＊1	1 ml
SYBR® *Premix Ex Taq* II（Perfect Real Time）（2 × conc.）＊1	1 ml
SYBR® Premix DimerEraser（Perfect Real Time）（2 × conc.）＊1	1 ml
ROX Reference Dye（50 × conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50 × conc.）＊2	200 μl

＊1：*TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+} および SYBR® Green I を含む。
＊2：Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。ABI PRISM® 7000 には ROX Reference Dye を、7500 および 7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を用いてください。Thermal Cycler Dice Real Time System や LightCycler® では必要ありません。

本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）
1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー ＊
4. 滅菌蒸留水
5. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

＊ リアルタイム PCR 用プライマーの設計方法は、「VI. (1) プライマー設計について」をご参照ください。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社のオンライン検索＆注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】のご利用を推奨致します。（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

III. 保存

4℃保存：6 ヶ月安定
必ず遮光してください。また、コンタミネーションには十分注意してください。

＊ 本製品はドライアイス直付けでお届けします。受け取り後、4℃で遮光保存してください。
＊ 長期保存する場合は、− 80℃で保存してください。（− 20℃保存は避けてください。）
いったん融解したものは 4℃保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

IV. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1）使用時には、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。
ボルテックスによる混合は行わないでください。
なお、SYBR® Premix（2 × conc.）を－ 80℃保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿を生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

（2）反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

（3）本製品は SYBR® Green I を含んでいます。反応液調製時に強い光をあてないよう注意してください。

（4）反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

V. 操作

SYBR® *Premix Ex Taq*（Perfect Real Time）および SYBR® *Premix Ex Taq* II（Perfect Real Time）の標準プロトコールはシャトル PCR（2 step PCR）です。一方、SYBR® Premix DimerEraser（Perfect Real Time）では 3 step PCR を標準プロトコールとして推奨しています。

各製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS は、ポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq 抗*体を利用したホットスタート PCR 酵素です。化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前の鋳型の初期変性も、通常 95℃ 30 秒で十分です。

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度／添加量
各種 SYBR® Premix（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
Template	2 μl	＜100 ng ＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	up to 25 μl	
Total	25 μl ＊3	

試薬	Primer 使用量（x）	Primer 最終濃度（y）
SYBR® *Premix Ex Taq*	0.5 μl	0.2 μM
SYBR® *Premix Ex Taq* II	1.0 μl	0.4 μM
SYBR® Premix DimerEraser	0.75 μl	0.3 μM

＊1： Primer 使用量は試薬によって異なる。まず上表の推奨使用量を試し、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

＊3： 反応液量は 25 μlを推奨

2. 反応を開始する。

PCR 条件は試薬によって異なります。まずは、下記に示す各試薬の標準プロトコールでお試しください。

▶ SYBR® *Premix Ex Taq* および SYBR® *Premix Ex Taq* II

初期変性（Hold）95℃ 30 秒 → 2 step PCR サイクル数：40 95℃ 5 秒 60℃ 30 秒 → 融解曲線分析（Dissociation）

▶ SYBR® Premix DimerEraser

初期変性（Hold）95℃ 30 秒 → 3 step PCR サイクル数：40 95℃ 5 秒 55℃ 30 秒 72℃ 30 秒 → 融解曲線分析（Dissociation）

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

Thermal Cycler Dice Real Time System での解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System 取扱説明書を参照してください。

＜ ABI PRISM® 7000 および Applied Biosystems 7500 Real Time System を用いる場合の操作方法＞

＊各機種の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度／添加量
各種 SYBR® Premix（2 ×）	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
ROX Reference Dye or Dye II（50 ×）	1 μl	1 × ＊2
Template	4 μl	＜ 200 ng ＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	up to 50 μl	
Total	50 μl ＊4	

試薬	Primer使用量（x）	Primer最終濃度（y）
SYBR® *Premix Ex Taq*	1.0 μl	0.2 μM
SYBR® *Premix Ex Taq* II	2.0 μl	0.4 μM
SYBR® Premix DimerEraser	1.5 μl	0.3 μM

＊ 1： Primer 使用量は試薬によって異なる。まず上表の推奨使用量を試し、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： ABI PRISM® 7000 には ROX Reference Dye（50 ×）を、7500 Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II（50 ×）を使用する。

＊ 3： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。50 μl 反応系では DNA template 200 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

＊ 4： 反応液量は 50 μl を推奨

2. 反応を開始する。

PCR 条件は試薬によって異なります。まずは、下記の各試薬の標準プロトコールでお試しください。

▶ SYBR® *Premix Ex Taq* および SYBR® *Premix Ex Taq* II

初期変性（Holding Stage）95℃ 30 秒 → 2 step PCR サイクル数：40 95℃ 5 秒 60℃ 31 or 34 秒＊ → 融解曲線分析（Melt Curve Stage）

▶ SYBR® Premix DimerEraser

初期変性（Holding Stage）95℃ 30 秒 → 3 step PCR サイクル数：40 95℃ 5 秒 55℃ 30 秒 72℃ 31 or 34 秒＊ → 融解曲線分析（Melt Curve Stage）

＊ 7000 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定します。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

＜ Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System を用いる場合の操作方法＞

＊ Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度／添加量
各種 SYBR® Premix（2 ×）	10 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
ROX Reference Dye II（50 ×）	0.4 μl	
Template	2 μl	＜ 100 ng ＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	up to 20 μl	
Total	20 μl ＊3	

試薬	Primer使用量（x）	Primer最終濃度（y）
SYBR® *Premix Ex Taq*	0.4 μl	0.2 μM
SYBR® *Premix Ex Taq* II	0.8 μl	0.4 μM
SYBR® Premix DimerEraser	0.6 μl	0.3 μM

＊ 1： Primer 使用量は試薬によって異なる。まず上表の推奨使用量を試し、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

＊ 3： 反応液量は 20 μl を推奨

2. 反応を開始する。

PCR 条件は試薬によって異なります。下記の各試薬の標準プロトコールでお試しください。

▶ SYBR® *Premix Ex Taq* および SYBR® *Premix Ex Taq* II

初期変性（Holding Stage）95℃ 30 秒 → 2 step PCR サイクル数：40 95℃ 3 秒 60℃ 30 秒 → 融解曲線分析（Melt Curve Stage）

▶ SYBR® Premix DimerEraser

初期変性（Holding Stage）95℃ 30 秒 → 3 step PCR サイクル数：40 95℃ 3 秒 55℃ 30 秒 72℃ 30 秒 → 融解曲線分析（Melt Curve Stage）

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

＜ LightCycler® を用いる場合の操作方法＞

＊ LightCycler®（Roche Diagnostics 社）の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度／添加量
各種 SYBR® Premix（2 ×）	10 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	x μl	y μM ＊1
Template	2 μl	＜ 100 ng ＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	up to 20 μl	
Total	20 μl ＊3	

試薬	Primer使用量（x）	Primer最終濃度（y）
SYBR® *Premix Ex Taq*	0.4 μl	0.2 μM
SYBR® *Premix Ex Taq* II	0.8 μl	0.4 μM
SYBR® Premix DimerEraser	0.6 μl	0.3 μM

＊ 1： Primer 使用量は試薬によって異なる。まず上表の推奨使用量を試し、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

＊ 3： 反応液量は 20 μl を推奨。

2. 反応を開始する。

PCR 条件は試薬によって異なります。まずは、下記の各試薬の標準プロトコールでお試しください。

▶ SYBR® *Premix Ex Taq* および SYBR® *Premix Ex Taq* II

初期変性（Holding Stage）95℃ 30 秒 → 2 step PCR サイクル数：40 95℃ 5 秒 60℃ 20 秒 → 融解曲線分析（Melt Curve Stage）

▶ SYBR® Premix DimerEraser

初期変性（Holding Stage）95℃ 30 秒 → 3 step PCR サイクル数：40 95℃ 5 秒 55℃ 30 秒 72℃ 30 秒 → 融解曲線分析（Melt Curve Stage）

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

実験条件の選び方

【ポイント】

実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。なお、試薬による反応性に大きな違いがない場合には、SYBR® *Premix Ex Taq* あるいは SYBR® *Premix Ex Taq* II を用いると 2 step PCR により短時間で反応が終了します。

○ 反応特異性が高い実験系
- No Template Control でプライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じない。
- 目的産物以外の非特異的増幅が生じない。

○ 増幅効率が高い実験系
- 増幅産物がより早いサイクルで検出される（Ct 値が小さい）。
- PCR 増幅効率が高い（理論値である 100% に近い）。

【試薬と反応性の関係】

各種 SYBR® Premix と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるには、SYBR® Premix DimerEraser の使用が有効です。やや増幅しにくい配列では、SYBR® *Premix Ex Taq* を使用することにより増幅効率が向上する場合があります。

（試薬）	SYBR® *Premix Ex Taq*		SYBR® *Premix Ex Taq* II		SYBR® Premix DimerEraser
反応特異性	やや低い	→		→	高い
増幅効率	高い	←		←	やや低い

【プライマー濃度と反応性の関係】

プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。

（プライマー濃度）	低濃度（0.1 μM）		高濃度（1.0 μM）
反応特異性	高い	←	低い
増幅効率	低い	→	高い

【PCR 条件と反応性の関係】

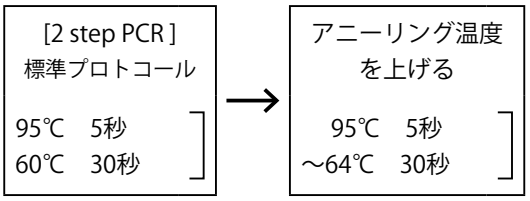
反応特異性を上げるには、アニーリング温度を上げるか 2 step PCR に変更します。
増幅効率を上げるには、伸長反応時間を延ばすか 3 step PCR に変更します。

○ 反応特異性を上げるには

3 step PCR が標準プロトコールの SYBR® Premix DimerEraser では、以下の手順で反応特異性を上げることができます。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。

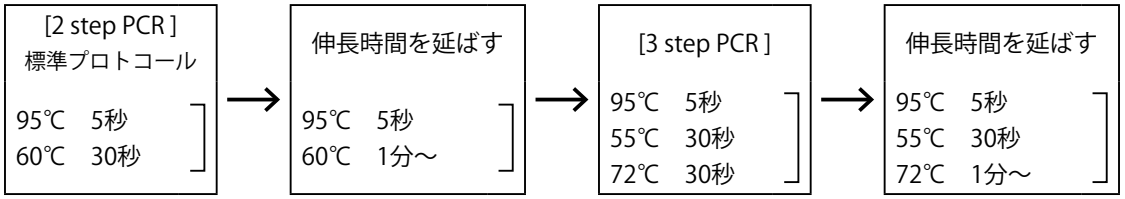
[3 step PCR] 標準プロトコール	→	アニーリング温度 を上げる	→	[2 step PCR]	→	アニーリング温度 を上げる
95℃　5秒 55℃　30秒 72℃　30秒		95℃　5秒 ～60℃　30秒 72℃　30秒		95℃　5秒 60℃　30秒		95℃　5秒 ～64℃　30秒

2 step PCR が標準プロトコールの SYBR® *Premix Ex Taq* や SYBR® *Premix Ex Taq* II の場合は、アニーリング温度を上げることで反応特異性が改善することがあります。

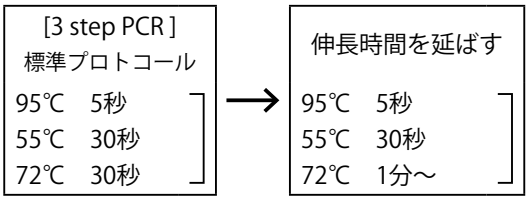


○ 増幅効率を上げるには

2 step PCR が標準プロトコールの SYBR® *Premix Ex Taq* や SYBR® *Premix Ex Taq* II では、以下の手順で増幅効率をアップできる場合があります。



3 step PCR が標準プロトコールである SYBR® Premix DimerEraser の場合は、伸長時間を延ばすことで増幅効率が改善することがあります。



VI. Appendix

（1）プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。
なお、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社オンライン検索 & 注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】＊のご利用を推奨致します。
（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対して、SYBR® Green I 検出リアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。
本トライアルパックの試薬と組み合わせる場合は、4 ～ 8 ページに示した各試薬の標準プロトコールで反応を行ってください。

■増幅産物

増幅サイズ	80 ～ 150 bp が最適（300 bp までは増幅可能）

■プライマー

長さ	17 ～ 25 mer
GC 含量	40 ～ 60%（望ましくは、45 ～ 55%）
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異ならないこと。 Tm 値の計算は、専用のソフトウエアで行う。 OLIGO™ ＊1：63 ～ 68℃ Primer3 ＊2：60 ～ 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする。 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3' 末端）。 T / C の連続（polypyrimidine）は避ける。 A / G の連続（polypurine）は避ける。
3' 末端配列	3' 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける。 3' 末端塩基は、G または C が望ましい。 3' 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい。
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける。 プライマーの 3' 末端同士が 2 base 以上相補する配列を避ける。
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する＊3。

＊1：OLIGO™ Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights 社）
＊2：Primer3（http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/）
＊3：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

※ タカラバイオ (株) では、【Perfect Real Time サポートシステム】に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。
詳細は、弊社販売課までお問い合わせください。
（東日本販売課：TEL 03-3271-8553、西日本販売課：TEL 077-543-7297）

（2）RT-PCR を行う場合

RT 反応には PrimeScript RT キットシリーズ（製品コード RR037A/B、RR036A/B、RR047A/B）の使用をお勧めします。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。以下には PrimeScript RT reagent Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR037A）を用いた例を示します。

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
   RNA サンプル以外のコンポーネントを必要な本数＋α調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
5×PrimeScript® Buffer（for Real Time）	2 μl	1×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer（50 μM）＊1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）＊1	0.5 μl	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O		
Total	10 μl ＊2	

＊ 1：Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer（50 μM）	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）	0.5 μl	50 pmol
Gene Specific Primer（2 μM）	0.5 μl	1 pmol

＊ 2：逆転写反応は、必要に応じてスケールアップしてください。10 μ l の反応液で逆転写出来るのは、およそ 500 ng までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。
   37℃、15 分＊ 3　（逆転写反応）
   85℃、5 秒　（逆転写酵素を熱失活させる）
   4℃

＊ 3：Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

合成した cDNA を鋳型とし、「V. 操作」に記載された方法に従ってリアルタイム PCR を実施します。

（3）使用例

本製品を使用してλDNA を鋳型としたリアルタイム PCR を行い 3 種類の SYBR® Premix の反応性を比較しました。なお、この反応の PCR 増幅サイズは推奨の範囲（80 ～ 150 bp）よりも長い 300 bp であり、やや増幅が困難な実験条件です。

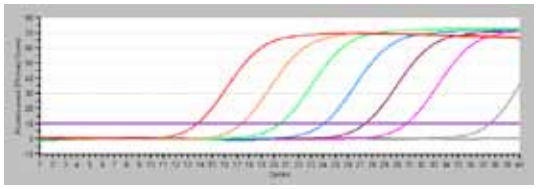
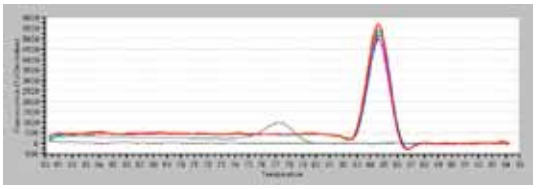
【方法】

試薬：	本製品の 3 種類の SYBR® Premix
PCR 条件：	各試薬の推奨条件
鋳型：	No Template Control（2 反応）、 λDNA 1 fg, 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg（各 1 反応）
増幅サイズ：	300 bp
装置：	Thermal Cycler Dice Real Time System

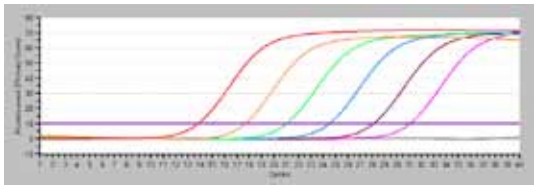
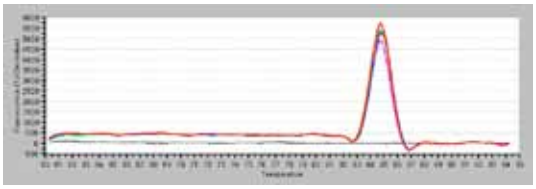
【結果】

○ 増幅曲線と融解曲線

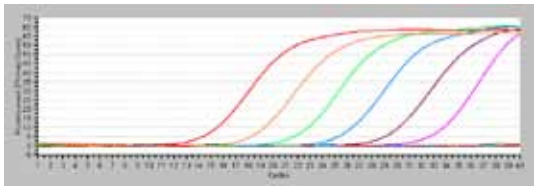
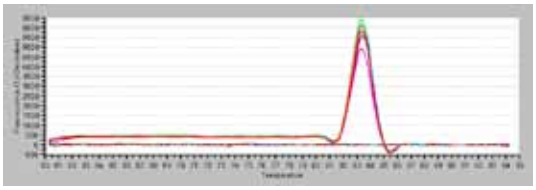
SYBR® *Premix Ex Taq*

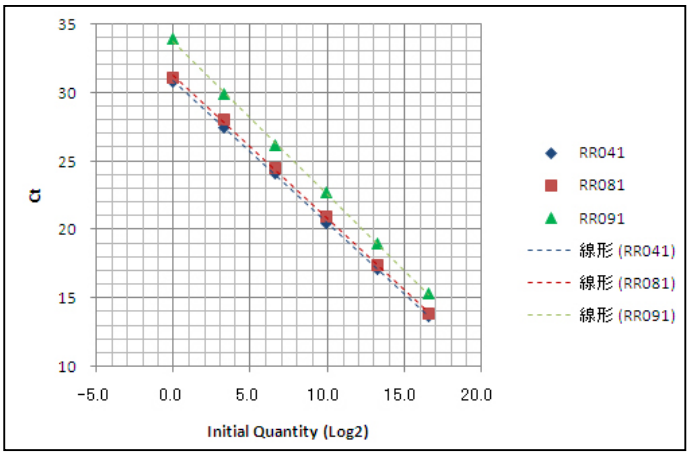
SYBR® *Premix Ex Taq* II

SYBR® Premix DimerEraser

○ 検量線と PCR 増幅効率



＜PCR増幅効率＞

SYBR® *Premix Ex Taq*	95%
SYBR® *Premix Ex Taq* II	94%
SYBR® Premix DimerEraser	86%

【考察】

○ 反応特異性について

SYBR® *Premix Ex Taq* では、2 反応の No Template Control のうち、1 反応でプライマーダイマーと思われる非特異的増幅が生じましたが、SYBR® *Premix Ex Taq* II と SYBR® Premix DimerEraser では No Template Control での増幅は認められず反応特異性は良好でした。

○ 増幅効率について

検量線から求めた PCR 増幅効率より、この反応では SYBR® *Premix Ex Taq* および SYBR® *Premix Ex Taq* II の方が SYBR® Premix DimerEraser よりも効率よく増幅できることが分かりました。

○ 実験系に適した試薬

反応特異性と増幅効率から総合的に判断して、この反応には SYBR® *Premix Ex Taq* II が適していると考えられます。

VII. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）（製品コード RR041A）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ 5 mL/25 mL（製品コード RR041L/RR041W）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ 5 mL/25 mL, ROX plus（製品コード RR41LR/RR41WR）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Perfect Real Time）（製品コード RR081A）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 5 mL/25 mL（製品コード RR081L/RR081W）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 5 mL/25 mL, ROX plus（製品コード RR81LR/RR81WR）
SYBR® Premix DimerEraser™（Perfect Real Time）（製品コード RR091A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR037A/B）
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）

VIII. 参考文献

1）吉崎美和, 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4.リアルタイム定量PCRのコツ、120-126
2）吉崎美和, 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイムPCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現解析, 39-43

IX. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診 断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- SYBR は Molecular Probes Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている商品名などは、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[P5] PCR Notice
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[L11] SYBR® Green I
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.
Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR/Melting Curve Analysis
The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[L52] Rox Reference Dye (Research Field)
Purchase of this product includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社

201108Da